

Aus dem Zentrallabor des akademischen
Lehrkrankenhauses der Universität Marburg/Lahn, Fulda

**EIN SCHNELLTEST ZUR QUANTITATIVEN
BESTIMMUNG DER 20-OXOSTEROIDE MIT HILFE EINER
3 α -, 20 β -HYDROXISTEROID:NAD-OXIDO-REDUKTASE
DIREKT IM URIN**

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von
Michael Wuttke
aus Fulda

Marburg 1976

Aus dem Zentrallabor des akademischen
Lehrkrankenhauses der Universität Marburg/Lahn, Fulda
Chefarzt: Dr. med. R. A L L N E R

Ein Schnelltest zur quantitativen
Bestimmung der 20-Oxosteroide mit Hilfe einer
3 α -, 20 β -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase
direkt im Urin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Michael Wuttke
aus Fulda

Marburg 1976



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Dr. med. R. Allner

Correferent: Prof. Dr. med. Kaffarnik

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Charakterisierung des Enzyms	1
1. Synthese, chemische Eigenschaften und Spezifität	1
2. Reinheit der käuflichen Enzympräparation	3
B) Eigene Untersuchungen über die Verwendbarkeit der 3 α -, 20 β -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase zur quantitativen Bestimmung von 20-Oxosteroiden	5
1. Material	5
2. Herstellung der Lösungen	5
3. Haltbarkeit der Lösungen	6
4. Arbeitsweise	6
5. Berechnung der Steroidkonzentration	8
6. Reaktionskinetik	9
7. Reaktionskinetik von Substratgemischen	10
8. Einfluß der Enzymmenge auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes	10
C) Beschreibung der Methode zur Bestimmung der 20-Oxosteroide mit Hilfe der 3 α -, 20 β -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase direkt im Urin	22
1. Reagenzien und Geräte	22
2. Methode	23
3. Diskussion der eigenen Ergebnisse	27
a) Nötige Leerwertkorrektur	27
b) Berechnung der 20-Oxosteroidkonzentration im Urin	29
c) Wiederfindung	29
d) Genauigkeit	31
e) Beeinflussung der Reaktionsfähigkeit des Enzyms durch Urine	31
f) Empfindlichkeit	33
g) Spezifität der Methode	33

	Seite
D) Normalwerte	37
E) Vergleich mit anderen Methoden	39
Zusammenfassung	42
Übersicht der in der Arbeit benutzten Nomen- klatur der Steroide	45
Literaturverzeichnis	47

A) Charakterisierung des Enzyms

1. Synthese, chemische Eigenschaften und Spezifität

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete 3α -, 20β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase ist ein Handelspräparat der Firma Boehringer Mannheim.

1958 fanden J. SCHMIDT-THOME et al einen Streptomycetenstamm (*Streptomyces hydrogenans*), der 20 -Oxosteroide zu 20β -Hydroxisteroiden umsetzt, und es gelang ihnen durch Induktion während der Wachstumsphase mit geeigneten Steroiden den Gehalt an 3α -, 20β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase auf den 20 -fachen Wert zu steigern (Lit. 1, 2). In einem Verfahren nach H.J. HÜBENER et al (Lit. 3) wird das Enzym als kristalline 3α -, 20β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase isoliert. Nach deren Untersuchungen katalysiert das Enzym die Reduktion von 20 -Oxogruppen der C_{21} -Steroide unter Bildung von 20β -Hydroxisteroiden in Gegenwart von NADH. (Abb. 1). Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt nahezu vollständig auf der Seite der Hydrierungsprodukte (Tab. 1).

Außerdem besitzt das Enzym neben der 20β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität eine 3α -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität gegenüber Derivaten der 3 - Ol - 5α -Androstan-Reihe bei Gegenwart von NAD (Abb. 2).

Die Spezifität der 3α -, 20β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase gegenüber C_{21} -Steroiden erstreckt sich sowohl auf die C_{20} -Position der Oxogruppe, als auch auf den sterischen Verlauf der Reaktion in β -Stellung (Lit. 5).

Durch 20 β -Steroiddehydrogenase katalysierte Reaktion

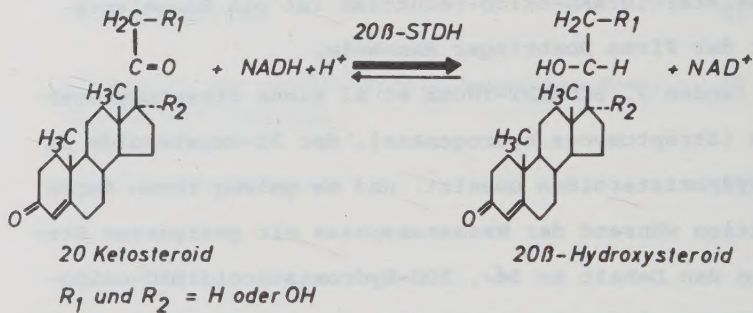


Abb. 1: Durch 3 α -, 20 β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase katalysierte Reaktion nach H.J. HÜBENER und C.O. LEHMANN (Lit. 4)

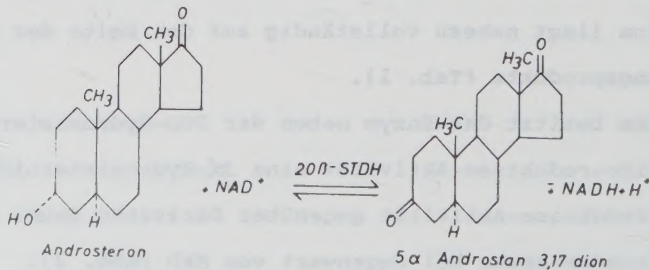


Abb. 2: Reaktionsablauf der 3 α -Hydroxylase-Aktivität der "20 β -STDH" mit dem Substrat Androsteron (Lit. 7)

2. Reinheit der käuflichen Enzympräparation

Die von der Firma Boehringer bezogene 20B-STDH enthielt nach unseren Erfahrungen stets eine NADH-Oxidase mit von Charge zu Charge unterschiedlicher Aktivität.

Spezifität der 3 α -, 20 β -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase

Substrateinwaage 10 μ g/A	gemessener Substrat- umsatz mit		Zeitpunkt des er- mittelten Reaktion stillstandes in Minuten
	NAD in %	NADH ₂	
Progesteron	0	100	
Pregnandiol	0	0	
Cortisol	0	100	9
Tetrahydrocortisol	0	95	15
Allotetrahydrocortisol	0	100	15
Cortison	0	98	9
Tetrahydrocortison	0	100	15
Reichsteins Compound S	0	98	3
Tetrahydro-Compound S	0	100	9
Corticosteron	0	100	45
Tetrahydrocorticosteron	0	98	210
Allotetrahydrocorticost.	0	100	60
Desoxycorticosteron	0	98	9
Tetrahydrodesoxycortic.	0	100	
11-Dehydrocorticosteron	0	100	30
Tetrahydro Compound A	0	100	30
β -Cortolon	0	0	
Testosteron	0	0	
Androsteron	27	0	30
Epiandrosteron	0	0	
11 β -Hydroxyandrosteron	16	0	180
11 α -Hydroxyandrosteron	18	0	180
11-Ketoandrosteron	32	0	174
Δ 4-Androstendion	0	0	
Dehydroepiandrosteron	0	0	
Ätiocholanolon	0	0	
11 β -Hydroxyätiocholanol.	0	0	
11-Ketoätiocholanolon	0	0	
Ätiocholan-3,11,17-trion	0	0	
Östron	0	0	
Östriol	0	0	
17 β -Östradiol	0	0	
α -Fluor-16 α -methylpredn.0		0	
11 β -Hydroxyätiochol.-3-on0		0	

Tab. 1: Spezifität der 20 β -STDH gegenüber verschiedenen Steroid

B) Eigene Untersuchungen über die Verwendbarkeit der
3 α -20 β -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase zur
quantitativen Bestimmung von 20-Oxosteroiden

In Modellversuchen sind zunächst die chemischen Eigenschaften der 20 β -STDH untersucht worden.

1. Material

Die Firma Ikapharm Ltd., Ramt-gan, Israel, lieferte alle untersuchten Steroide, deren Reinheitsgrad dünnschicht-chromatographisch überprüft wurde. Die Pyridinnukleotide NADH, NAD und das Enzym 20 β -STDH wurden von der Firma Boehringer, Mannheim GmbH, Biochemica Werk Tutzing, bezogen. Die übrigen Chemikalien waren von der Firma E. Merck, Darmstadt.

2. Herstellung der Lösungen

(in Anlehnung an H.J. HÜBENER, Lit. 14)

1) TRA-Puffer (0,1 molar; pH 7,3)

1,86 g Tri-äthanolamin-hydrochlorid in etwa 90 ml aqua dest. lösen, auf pH 7,3 mit 0,1 n HCl-Lösung einstellen und mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

2) Glycerin-Puffer-Gemisch (1+1/V+V)

Es wird aus Lösung 1 und Glycerin (doppelt dest.) je nach Bedarf und angegebenem Mischungsverhältnis hergestellt.

3) NADH-Lösung (15×10^{-3} molar)

10,5 mg NADH-Dinatriumsalz in 1 ml Lösung 1 lösen.

- 4) NAD-Lösung (15×10^{-3} molar)
10 mg NAD in 1 ml Lösung 1 lösen.
- 5) Steroidstandardlösungen
3 mg Steroid in 1 ml abs. Äthanol lösen.
- 6) ~~3 α~~ -, 20 β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase
(Handelsbezeichnung 20 β -Hydroxisteroid-Dehydrogenase, 20 β -STDH), Handelspräparat der Firma Boehringer, Mannheim, Art. Nr. 15339
5 mg Enzymprotein in 1 ml 2,2 molarer Ammoniumsulfatlösung suspendieren (spezifische Aktivität 22 U/mg).

3. Haltbarkeit der Lösungen

Die NADH-Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt, die NAD-Lösung jeweils vor den Versuchen. Die Steroidlösungen lagerten bei 4° C etwa bis 8 Wochen lang. Die Enzymsuspension verlor innerhalb von 6 Monaten nichts an Aktivität. Die Pufferlösung war praktisch unbegrenzt haltbar.

4. Arbeitsweise

Da jede benutzte Enzymcharge eine NADH-Oxidase enthält, muß in den Ansätzen der hierdurch bedingte unspezifische NADH-Verbrauch berücksichtigt werden. Zu diesem Zweck werden zur Berechnung des Leerwertes geeignete Leeransätze (LW) mitgeführt, die sich vom Hauptansatz (HW) durch Fehlen der Steroide unterscheiden.

Für den Hauptansatz HW und den Leeransatz LW werden

nacheinander in je ein Eppendorf-Mikroreagenzgefäß
pipettiert:

- 1) 1, 00 ml Glyzerin-Puffer-Gemisch (Lösung 2)
- 2) 0, 02 ml NADH- oder NAD-Lösung (Lösung 3 oder 4)
- 3) In den Hauptansatz die gewünschte Menge an Steroid-
lösung (Lösung 5),

in den Leeransatz die entsprechende Menge an abs.
Äthanol.

Die Ansätze werden ca. 3 min geschüttelt, klarzentrifugiert und quantitativ in die Mikrotrogküvetten lang (MT₄, 1 cm Schichtdicke) pipettiert. Mit einem selbstregistrierenden Photometer Eppendorf mit Sechsfach-Küvettenwechselautomatik wird bei 25° C und einer Meßstrahlung von 366 nm oder 334 nm gemessen. Die Eichung des Gerätes erfolgt gegen Luft. Bleiben innerhalb einer Zeitspanne von 6 min die Extinktionen der obigen Ansätze unverändert, erfolgt nacheinander das Zumischen von 0,005 ml Enzymsuspension der 20ß-STDH zum Hauptansatz HW und zum Leeransatz LW mit einem abgeflachten Glasstab unter Vermeiden von Schaumbildung. Dies ist für die Registrierung der Extinktionen des Hauptwertes und des Leerwertes der Zeitpunkt t_0 , der Reaktionsstart. Nach 4 Stunden Reaktionsdauer werden die Extinktionen im Haupt- und Leerwert wieder gemessen, $E_{t\ 240'}(HW)$ und $E_{t\ 240'}(LW)$. Bei dieser langen Reaktionszeit können auch die Substratumsätze mit langer Reaktionszeit quantitativ erfaßt werden.

5. Berechnung der Steroidkonzentration

Grundlage für die Berechnung ist folgende Formel:

$$\frac{E_{t\ 240'}(HW - LW)}{\epsilon \cdot d} = \mu\text{Mol Steroid/Ansatz}$$

In dieser Formel bedeuten

$$E_{t\ 240'}(HW - LW) = \left[E_{t_{0'}}(HW) - E_{t_{240'}}(HW) \right] - \left[E_{t_{0'}}(LW) - E_{t_{240'}}(LW) \right]$$

ϵ = Extinktionskoeffizient cm^2/Mol von NADH
bei 334 nm = 6,0
bei 366 nm = 3,3

d = Schichtdicke der Küvetten = 1 cm

Bei Kenntnis der Molekulargewichte der Steroide kann man dann von Mol Steroid/Ansatz auf g Steroid pro Ansatz umrechnen.

6. Reaktionskinetik

In Abhängigkeit von Substituenten am Steroidgerüst werden die einzelnen Oxosteroide unterschiedlich schnell umgesetzt (Tab. 1). Die Beobachtungen wurden an Substraten gewonnen, die die wichtigsten Vertreter dieser Stoffgruppe im menschlichen Urin darstellen. Ausführliche Untersuchungsergebnisse zu dieser Fragestellung werden von SCHMIDT-THOME et al (Lit. 5) und von GIBB und JEFFERY (Lit. 8, 9, 10) mitgeteilt.

Der Substratumsatz bei den geprüften Oxosteroiden verlief bei Mengen von 5 - 30 γ Oxosteroid pro Ansatz linear (Abb. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Der Variationskoeffizient der doppelten Standardabweichung lag bei 10-fach-Messungen zwischen 3 und 10 %.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die 17 α -Hydroxigruppe und die 11-Oxogruppe beschleunigt, eine 11-Hydroxigruppe oder das Fehlen einer 17-Hydroxigruppe setzen die Reaktionsgeschwindigkeit herab. Dagegen wird sie durch eine $\Delta_{4,3}$ -Oxogruppe erhöht. Bei Tetrahydroverbindungen ist die Reaktionsgeschwindigkeit häufiger geringer gegenüber den Verbindungen mit $\Delta_{4,3}$ -Oxogruppen. Sie wird außerdem von der Cis-trans-Isomerie der Ringe A und B beeinflusst. 5 α -Tetrahydrocortison wird schneller umgesetzt als Tetrahydrocortison. Der geschwindigkeitserhöhende Effekt der 11-Oxogruppe wird am Beispiel mit Reichsteins-Substanz-A deutlich. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist größer als bei Tetrahydrocorticosteron. Desoxy-

corticosteron hat nur die $\Delta_{4,3}$ -Oxo-Konfiguration des Ringes A als Schrittmacher für die Reaktionsgeschwindigkeit. Dieses Substrat wird von allen 17-Desoxi, 20-Oxosteroiden am schnellsten umgesetzt. Fehlende 17 α -Hydroxigruppe, fehlende $\Delta_{4,3}$ -Oxo-Konfiguration und vorhandene 11-Hydroxigruppe führen bei Tetrahydrocorticosteron zu einer extremen Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit pro Zeit (Abb. 8).

Die vorhandene 3 α -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität des Enzyms wird später besprochen.

7. Reaktionskinetik von Substratgemischen

Aus Versuchen mit verschiedenen 20-Oxosteroidgemischen zeigte sich, daß sich die Substrate in ihrem Umsatz nicht gegenseitig beeinflussen (Abb. 13, 14) (Lit. 7).

Die Reaktionszeit bis zum Erreichen des Endpunktes wird in Substratgemischen von dem Substrat bestimmt, das die längste Reaktionszeit bis zum vollständigen Substratumsatz benötigt. Die in Einzelsubstratanalysen gewonnenen Reaktionszeiten werden durch Substratgemische nicht verändert.

8. Einfluß der Enzymmenge auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes

Man kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch Steigerung der 20 β -STDH-Menge erhöhen (Abb. 15).

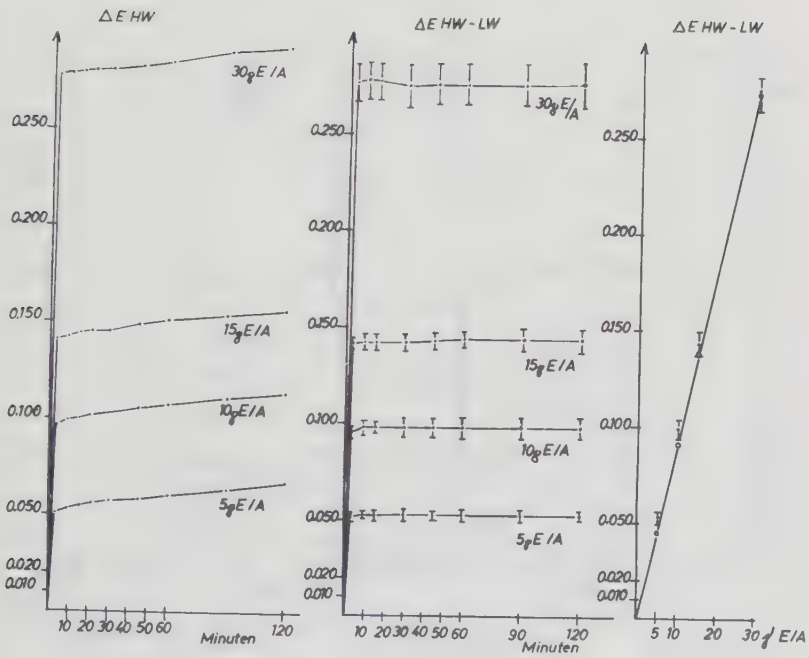


Abb. 3: a) Darstellung des Substratumsatzes von
Cortison pro Zeit ΔE_{HW} , gemessen bei 366 nm
b) nach Abzug des Leerwertes $\Delta E_{(HW-LW)}$
c) Eichkurve für Cortison, Mittelwert und
einfache Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$)

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N} - \frac{N \cdot \bar{x}^2}{1}}$$

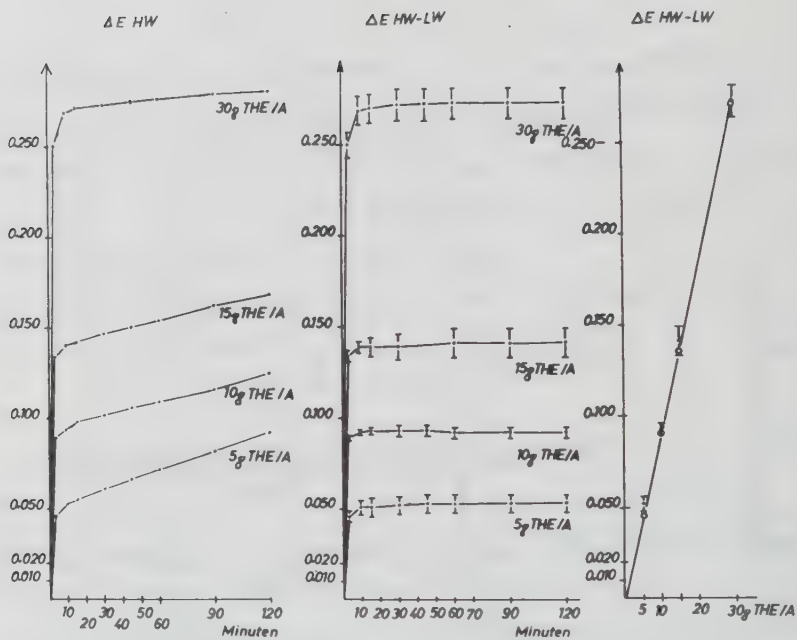


Abb. 4: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für THE

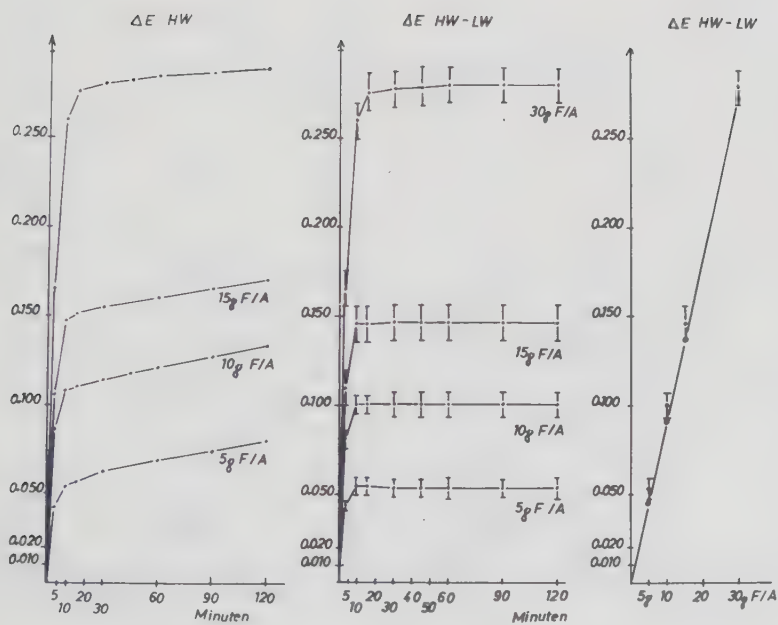


Abb. 5: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für F

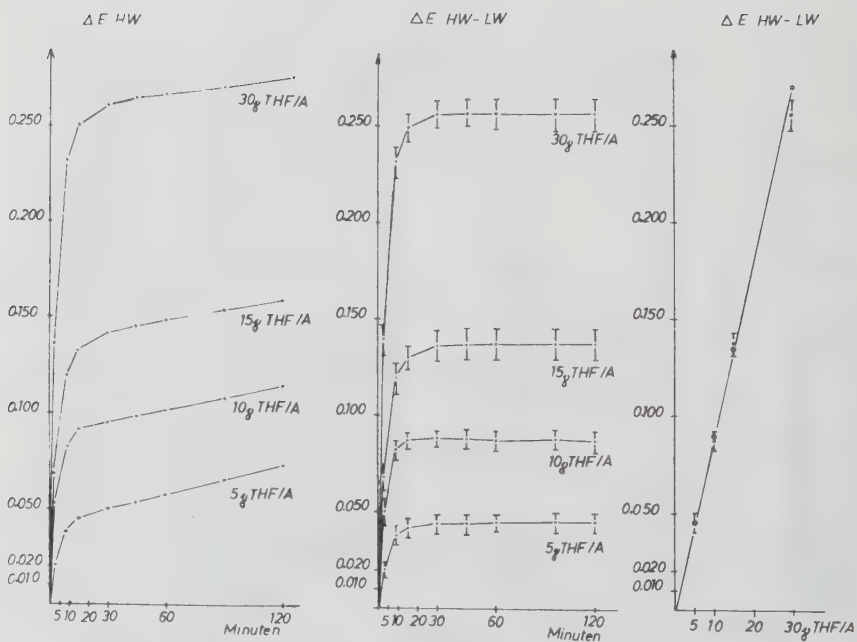


Abb. 6: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für THF

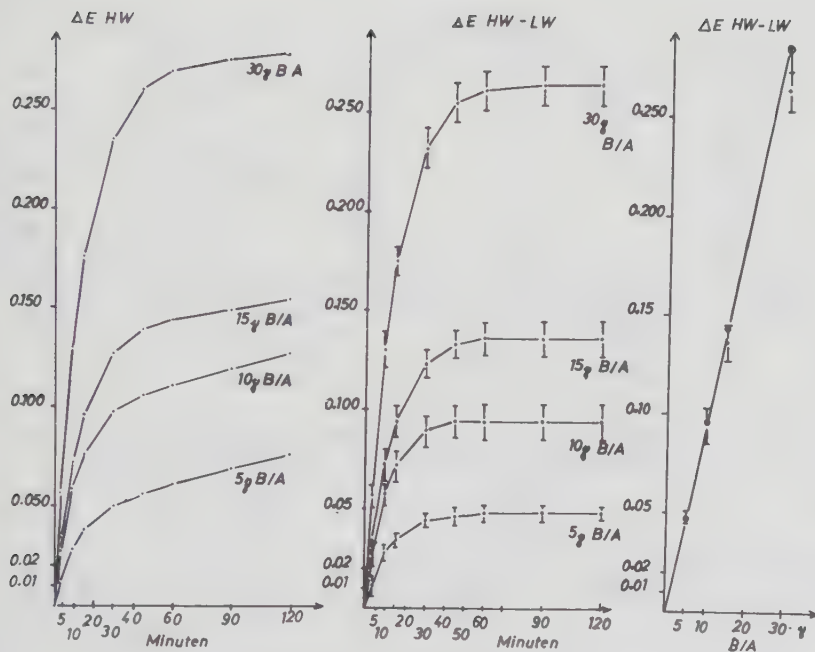


Abb. 7: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für B

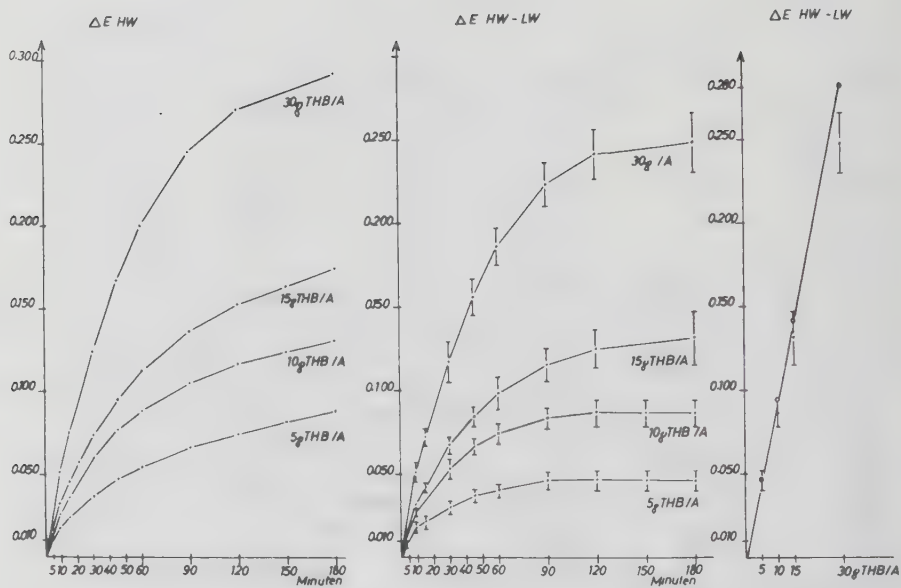


Abb. 8: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für THB

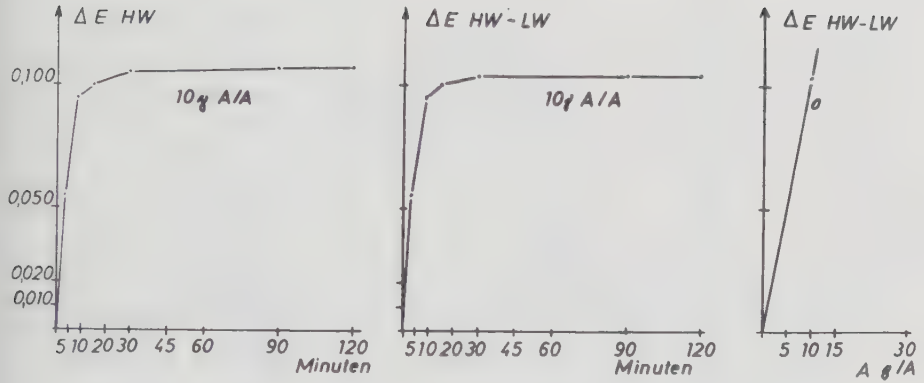


Abb. 9: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für A

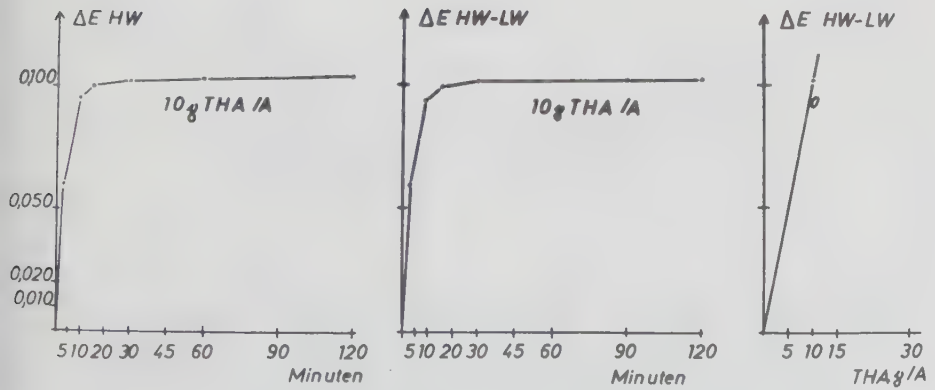


Abb. 10: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für THA

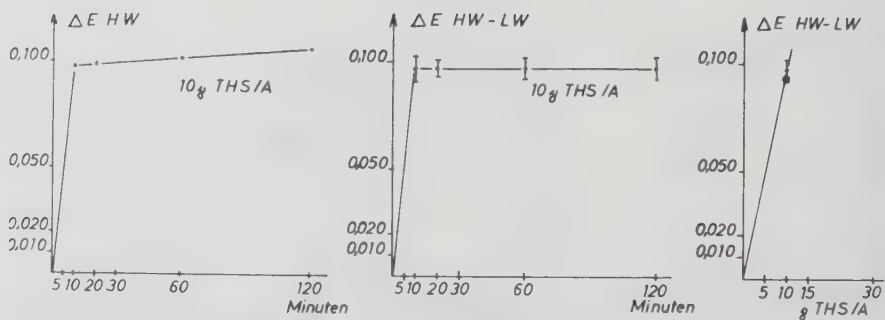


Abb. 11: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für THS

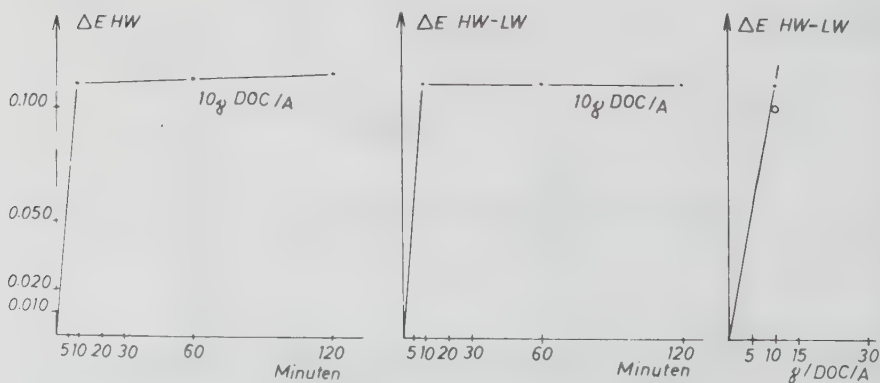


Abb. 12: a), b), c) wie in Abb. 3, aber für DOC

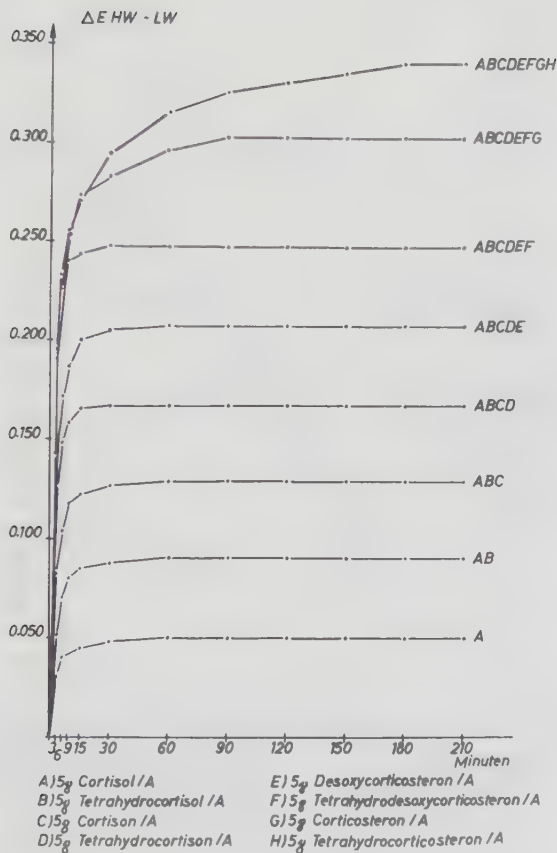


Abb. 13: Darstellung des Substratumsatzes und des Einflusses einzelner Oxosteroides in Substratgemischen auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes pro Zeit,

$\Delta E (HW - LW)/min$, bei 366 nm, (Lit. 7)

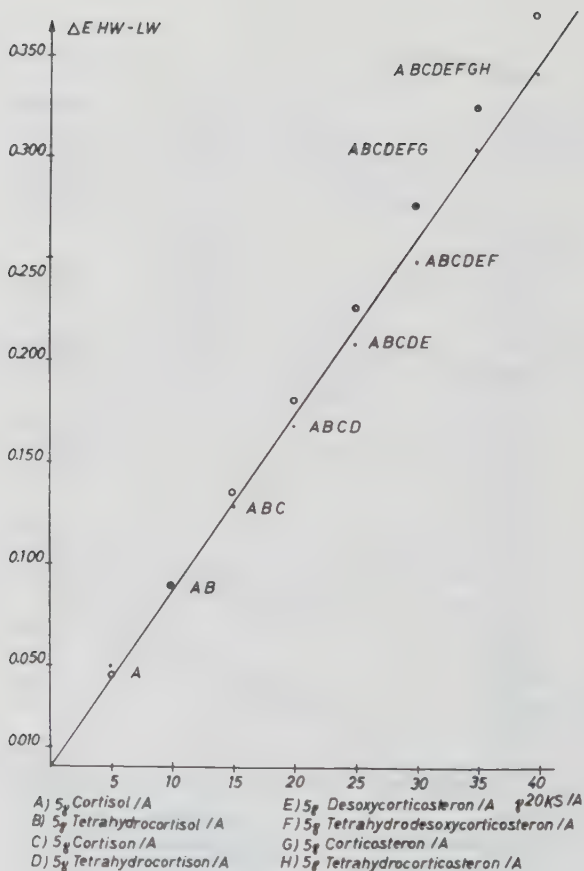


Abb. 14: Darstellung der gefundenen Endwerte aus Abb. 13

$\Delta E (HW - LW)_{240'}$, (Lit. 7),

Die Kreise zeigen die bei einem äquimolaren Substratumsatz zu erwartenden ΔE -Werte pro Substratkonzentration pro Ansatz.

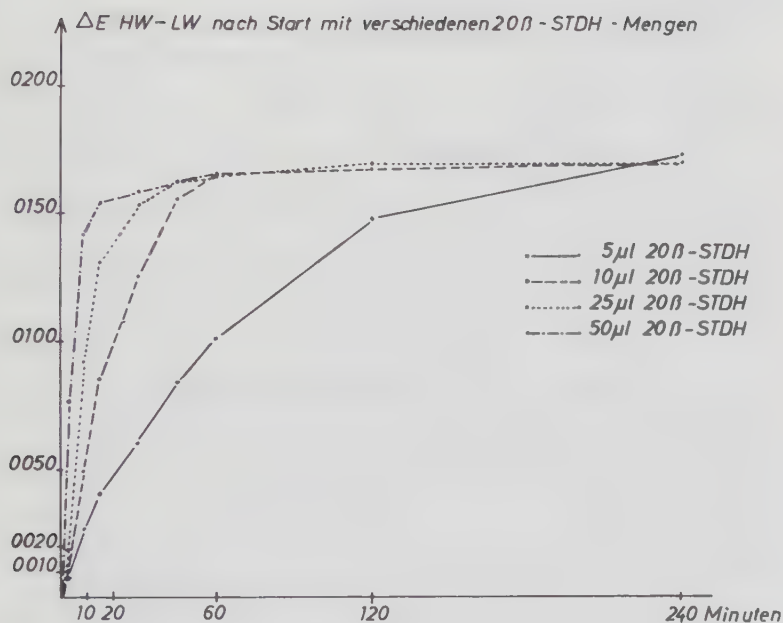


Abb. 15: Einfluß der Enzymmenge auf die Substratumsatzgeschwindigkeit,
Substrat THB 15 γ /Ansatz, gemessen bei 366 nm

C) Beschreibung der Methode zur Bestimmung der 20-Oxo-steroido mit Hilfe der 3 α -, 20 β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase direkt im Urin

1. Reagenzien und Geräte

a) Reagenzien

- 1) β -Glucuronidase (aus E. Coli)
Firma Boehringer, Mannheim
Art. Nr.: 15240
- 2) Glyzerin, doppelt destilliert
Firma E. Merck, Darmstadt
Bestell-Nr.: 4094
- 3) NADH-Lösung (15×10^{-3} molar)
(10,5 mg NADH-Dinatriumsalz in 1 ml 1 % NaHCO₃-Lösung)
Firma Boehringer, Mannheim
Art. Nr.: 15297
- 4) 3 α -, 20 β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase
(20 β -STDH, ca. 100 U/ml)
Firma Boehringer, Mannheim
Art. Nr.: 15339
- 5) Essigsäure und
- 6) Natronlauge zum Einstellen der jeweiligen pH-Werte

b) Geräte

Benutzt wurde ein Photometer Eppendorf mit Küvettenwechsel-automatik und Registriereinheit, die Meßstrahlung war 334 oder 366 nm, die Reaktionstemperatur betrug 25° C. Die Vorbehandlung des Urins erfolgte in Zentrifugengläsern mit 10 ml Füllvolumen aus hitzebeständigem Glas, die weitere Verarbeitung erfolgte in Mikroreagenzgefäßen der Firma Eppendorf. Zum Pipettieren wurden für Volumina $> 1,0$ ml

graduierte geeichte Glaspipetten benutzt, für Volumina $< 1,0$ ml standen sogenannte Marburg-Pipetten zur Verfügung. Die Meßansätze erfolgten in Mikrotroglküvetten (MT₄) lang, mit der Schichtdicke $d = 1$ cm.

2. Methode (Tab. 2)

- 1) Zum Ansatz kommen 5 ml Urin, der vorher durch Zentrifugieren geklärt wird.
- 2) Zur enzymatischen Ersterspaltung erwies sich ein Zusatz von 0,05 ml β -Glucuronidase (E. Coli)/5 ml Urin bei einer Reaktionszeit von 30 min und einem pH-Optimum von 6,0 als brauchbar (Abb. 16).
- 3) Vor der eigentlichen Substratmessung müssen nach erfolgter Esterspaltung Proteine und Salze abgetrennt werden, da sie im Meßansatz zu Trübungen führen. Deshalb sind nach der Esterspaltung noch folgende analytischen Schritte notwendig:
 - a) Ansäuern des Urins mit Essigsäure auf $\text{pH} < 3,0$
 - b) Kurzes Aufkochen (hierbei werden die zugefügten Esterasen denaturiert)
 - c) Abkühlen und anschließend zentrifugieren, dann dekantieren des Überstandes
 - d) Alkalisieren des gewonnenen Überstandes auf $\text{pH} 9,0$ mit NaOH, nochmaliges Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes

- 4) Der nun gereinigte Urin wird mit Glyzerin, das ebenfalls das Auftreten von Trübungen vermindert und als Lösungsvermittler für die freigewordenen Steroide dient, zu gleichen Teilen gemischt. Anschließend wird die für die Reaktion mit der 20 β -STDH optimale Wasserstoffionenkonzentration von pH 7,3 mit Essigsäure eingestellt.
- 5) In zwei Eppendorf-Mikroreagenzgefäße werden je 1,5 ml aus demselben Urin-Glyzerin-Gemisch pipettiert und nach Hinzufügen von 0,03 ml NADH-Lösung gemischt (3 min) und klarzentrifugiert (5 min).
- 6) Je 1 ml dieser hergestellten Gemische werden zum Reaktionsansatz in je eine Mikrotrogküvette überpipettiert. Ein Ansatz dient der spezifischen Substratbestimmung (Hauptwert = HW), der zweite Ansatz zur Bestimmung des unspezifischen NADH-Verbrauchs (Leerwert = LW₁).
- 7) 15 min lang nach Einfüllen der Lösungen in die Küvetten werden HW und LW₁ in dem gegen Luft geeichten Photometer Eppendorf registriert. Die Extinktionsänderung pro Zeit muß linear sein.
- 8) Danach werden im HW und im zeitlich parallel laufenden LW₁ die Extinktionen E_{t_0} gemessen und anschließend die 20 β -STDH (0,005 ml) in den Hauptwert vorsichtig unter Vermeiden von Schaumbildung zugemischt.

- 9) Eine 2. und 3. Messung der Extinktionsänderung im HW und LW_1 erfolgt nach $240' = E_{240'}$ und $300' = E_{300'}$ nach Start der Reaktion.

summarische Bestimmung der 20-Ketosteroide im Urin bei Verzicht auf Extraktions- und Reinigungsverfahren			
enzymatische Esterspaltung	50 ml Urin (klar zentrifugiert)	pH 6,0 einstellen	
	+ 50 µl 0,1 Glucuronidase Q1 U/Ansatz	30 Minuten bei 37°C Inkubieren	
spezielle Vorbehandlung		pH < 3,0 einstellen, aufkochen, abkühlen, zentrifugieren	
	40 ml Überstand	pH > 9,0 einstellen, zentrifugieren	
Messung	20 ml Überstand		
	20 ml Glycerin	mischen, pH 7,3 einstellen	
Hauptwert	(HW)	Leerwert (LW)	
10 ml	Urin-Glycerin	10 ml	messen in MT 4 Küvetten
200 µl	NADH-H ⁺ Lösung	200 µl	Lichtquelle 334 nm o. 366 nm
	15 · 10 ⁻⁴ molar		1 cm Schichtdicke
1. Messung	Extinktion 1 (E_{10})		
	50 µl 20 N-STDH Lösung		
	5 mg/l ml		
2. Messung	Extinktion 2 ($E_{1240'}$)	240 Minuten nach Enzymstart	
3. Messung	Extinktion 3 ($E_{1300'}$)	300 Minuten nach Enzymstart	
Berechnung	$\Delta E_{HW_{1240'}} = (E_{10} \cdot HW - E_{1240'} \cdot HW)$		
	$\Delta E_{LW_{1240'}} = (E_{10} \cdot LW - E_{1240'} \cdot LW)$		
	$\Delta E_{LW_{1240'}} = (E_{1240'} \cdot HW - E_{1300'} \cdot LW) \cdot (HW - E_{1300'} \cdot LW)$		
	$\Delta E_{korr_{1240'}} = (\Delta E_{HW_{1240'}} - \Delta E_{LW_{1240'}}) \cdot 4 = \Delta E_{LW_{1240'}}$		
	$\Delta E_{korr_{1240'}} = \text{Faktor} \cdot \text{Urinmenge} = \text{mg 20 KS / 24 Stunden}$		

Tab. 2: Schematische Darstellung der einzelnen analytischen Schritte zur Bestimmung der 20-Oxosteroide bei Verzicht auf Extraktions- und Reinigungsverfahren

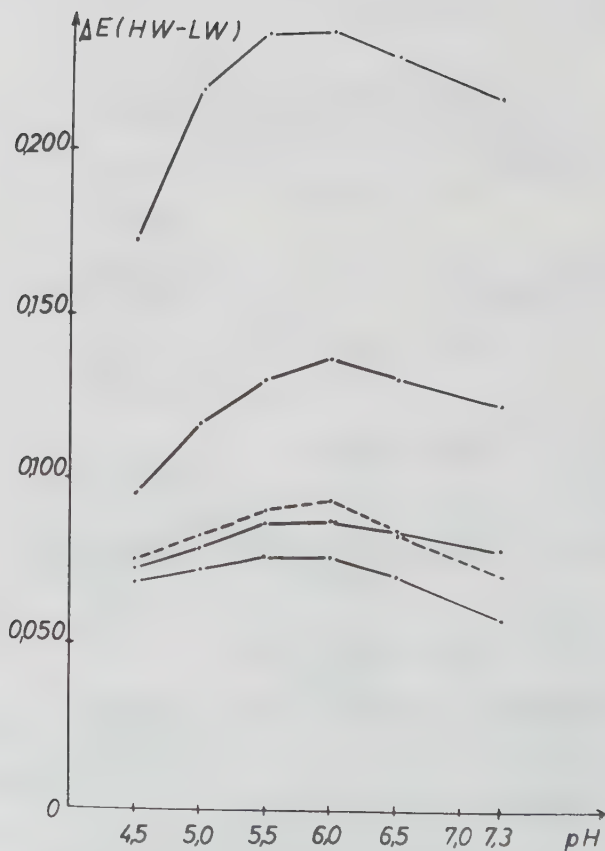


Abb. 16: pH-Optimum der β -Glucuronidase, bestimmt anhand des meßbaren Substratumsatzes
 $\Delta E (HW - LW)$

3. Diskussion der eigenen Ergebnisse

a) Nötige Leerwertkorrektur (Abb. 17)

Mit dem Ansatz LW_1 erfolgt die Messung eines unspezifischen NADH-Verbrauchs im Urin. Er unterscheidet sich vom HW-Ansatz durch das Fehlen der 20 β -STDH-Lösung. Außerdem enthält die 20 β -STDH der Firma Boehringer eine geringe Menge einer NADH-Oxidase-Aktivität. Der durch sie entstandene NADH-Verbrauch geht als LW_2 in die Berechnung ein. Da im HW-Ansatz 240 min nach Reaktionsstart alle 20-Oxosteroide umgesetzt sind (Tab. 1), entspricht die zwischen 240 min und 300 min meßbare Extinktionsänderung nach Abzug der jeweiligen LW_1 -Werte dieser NADH-Oxidase-Aktivität pro Stunde. Das NADH liegt als Substrat für die im Ansatz vorhandene NADH-Oxidase während der ganzen Meßzeit im Überschuß vor, und daher verläuft diese Reaktion pro Zeit linear. Zwei bisher untersuchte Enzymchargen hatten eine NADH-Oxidase-Aktivität, die zu einer Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,012 \pm 0,002$ pro Stunde bei 50 Messungen führte.

Bestimmung der 20-Ketosteroidkonzentration im Ansatz
durch Messung des spezifischen $\text{NADH} \cdot \text{H}^+$ - Verbrauchs = $\text{HW} - (\text{LW}_1 + \text{LW}_2)$

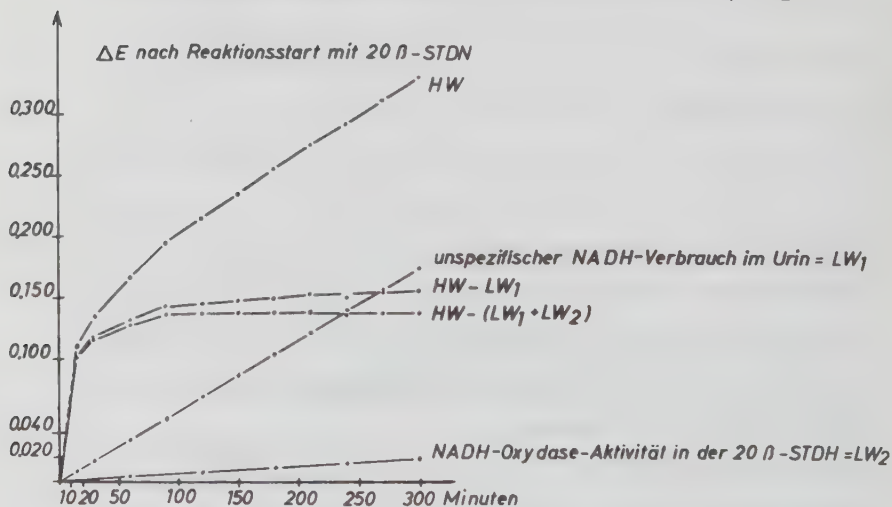


Abb. 17: Reaktionsdifferenzen pro Zeit, die im Hauptwert (HW), im Leerwert (LW_1) und durch die NADH-Oxidase-Aktivität (LW_2) hervorgerufen werden.

b) Berechnung der 20-Oxosteroidkonzentration im Urin

Für die Berechnung der 20-Oxosteroidkonzentration im Urin wird eine mehrfach korrigierte Extinktionsdifferenz von E_{t_0} , und $E_{t_{240'}}$ ($\Delta E_{\text{korrr } t_{240'}}$) benötigt.

Grundlage ist folgende Formel:

$$\Delta E_{\text{korrr } t_{240'}} \cdot \text{Faktor} \cdot \text{Urinmenge} / 24 \text{ Stunden} = \text{mg}$$

20 KS/24 Std.

Begriffserklärung:

$$\text{Faktor} = \frac{\text{MG} \cdot 2,05}{\epsilon \cdot d \cdot 10^3}$$

Urinmenge: ml der 24-Stundenausscheidung

ϵ : Extinktionskoeffizient $\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$ von **NADH**
bei 334 nm = 6,0
bei 366 nm = 3,3

d : Schichtdicke = 1 cm

10^3 : Umrechnung von μg auf mg

MG : Molekulargewicht von Cortisol = 362,4

2,05 : Verdünnungsfaktor zur Berechnung auf 1 ml Urin

c) Wiederfindung (Tab. 3, 4)

Unterschiedlichen Urinen wurden verschiedene 20-Oxosteroide zugesetzt und so anhand der Wiederfindungen die Richtigkeit der Methode geprüft. Es wurden zwischen 90 und 100 % der den Urinen zugefügten Steroide wiedergefunden. Die Substrate wurden am Anfang der Bearbeitung des Urines noch vor der Inkubation mit der β -Glucuronidase (E. Coli) dem Urin hinzugefügt.

Wiederfindung dem Urin zugesetzter Substrate bei Verzicht auf Extraktions-u. Reinigungsverfahren. $\Delta E = HW(E_{10} - E_{240'}) - LW(E_{10} - E_{240'})$						
Substrat dem Urin zugesetzt	20-KS _g /A im Urin	g/A Zusatz	N	Wiederfindung		
				$\bar{X}$	$\pm \sigma$	VK%
Cortison	5 - 100	5	10	97	5,5	5,7
Tetrahydrocortison	"	5	10	99	7,4	7,5
Cortisol	"	5	10	94	6,4	6,9
Tetrahydrocortisol	"	5	10	99	8,4	8,4
Corticosteron	"	5	10	97	5,8	6,0
Tetrahydrocorticosteron	"	2,5-10	19	97	6,1	6,3
Reichstein's Compound A	"	5-10	10	99	5,7	5,7
Reichstein's Compound THA	"	5	10	103	5,4	5,3
Reichstein's Compound S	"	5-10	10	94	5,8	6,2
Reichstein's Compound THS	"	5	10	99	4,3	4,4
Tetrahydrodesoxycorticosteron	"	5	10	93	5,8	6,3

Tab. 3: Wiederfindung der dem Urin zugesetzten 20-Oxosteroide, berechnet nach einer Reaktionszeit von 240 min

Wiederfindung dem Urin zugesetzter Substrate bei Verzicht auf Extraktions-u. Reinigungsverfahren $\Delta E = HW(E_{10} - E_{45'}) - LW(E_{10} - E_{45'})$						
Substrat, dem Urin zugesetzt	20-KS _g /A im Urin	g/A zugesetzt	N	Wiederfindung		
				$\bar{X}$	$\pm \sigma$	VK%
Cortison	5 - 100	5	10	97	6,2	6,4
Tetrahydrocortison	"	5	12	95	5,1	5,3
Cortisol	"	5	10	91	2,0	2,1
Tetrahydrocortisol	"	5	10	100	5,4	5,4
Corticosteron	"	5	10	66	19,4	29,2
Tetrahydrocorticosteron	"	2,5-10	19	39	22,0	56,2
Reichstein's Compound A	"	5-10	10	101	6,1	6,0
Reichstein's Compound THA	"	5	10	93	3,8	4,1
Reichstein's Compound S	"	5-10	10	94	3,5	3,7
Reichstein's Compound THS	"	5	10	91	4,7	5,1
Tetrahydrodesoxycorticosteron	"	5	10	97	6,6	6,8

Tab. 4: Wiederfindung der dem Urin zugesetzten 20-Oxosteroiden, berechnet nach einer Reaktionszeit nach 45min

d) Genauigkeit (Tab. 5)

Die Genauigkeit der Methode wurde an 37 Doppelansätzen geprüft. Der T-Test nach Student ergab, daß bei 70-80 % der gefundenen Ergebnisse zwischen den Doppelmessungen kein Unterschied bestand.

Ergebnisse von Wiederholungsversuchen bei Verzicht auf Extraktions- und Reinigungsverfahren						
Substratkonzentration 20 KS μ /A	Anzahl der Doppelansätze	Wiederholbarkeit (t - Test nach Student)				
		$\bar{X}_D$	$\pm \sigma_D$	$\sigma \bar{X}_D$	t	> P >
5 - 30	37	0,2973	482	0,7928	0,375	0,80/0,70

Tab. 5: Wiederholungsgenauigkeit bei Doppelbestimmungen

e) Beeinflussung der Reaktionsfähigkeit des Enzyms durch Urine (Tab. 6)

Um diese Frage zu klären, wurde die Reaktion am Ende der Reaktionszeit von 300 min durch Zusatz verschiedener Mengen von Tetrahydrocortison nachgestartet. Auch hier war in jedem Fall der Substratumsatz äquimolar. Die Wiederfindungen des Hormones entsprachen denen der anderen Versuche. Ebenso waren die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten gut vergleichbar. Die Beobachtungen zeigten, daß die Reaktionsfähigkeit des Enzyms durch Urine nicht gestört wird.

Urin 20KS g / A	"Nachstart" Menge THE g / A	Wieder- findung %
15,9	10	85
28,9	10	86
22,8	10	104
41,0	10	90
23,4	10	104
7,9	10	87
22,8	10	91
13,6	10	104
13,3	5	95
20,8	5	93
25,3	5	102
9,6	5	102
21,8	10	93
30,9	5	100
33,1	5	95
25,9	10	99
13,6	10	97
20,3	10	103
17,1	10	104
18,2	10	103
10,4	10	96
14,4	10	101
7,8	5	100
9,5	5	91
N		24
$\bar{x}$		96,9
$\pm \bar{G}$		6,2
VK %		6,4

Tab. 6: Wiederfindung von Tetrahydrocortison, das dem Reaktionsansatz 300 min nach Start der Reaktion zugesetzt wurde

f) Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit der Methode geht aus den aufgeführten Eichkurven hervor (Abb. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Unter Berücksichtigung der gefundenen Schwankungsbreiten bei Wiederholungsversuchen sind 20-Oxosteroidkonzentrationen von 2,5 μ /Ansatz sicher erfaßbar. Die bisher in den Urinen gefundenen ΔE der Leerwerte waren unterschiedlich in ihrer Größe, beeinflussten aber die Wiederfindungsversuche nicht. Die Eichkurven liegen in den geprüften Konzentrationsbereichen linear.

g) Spezifität der Methode

Die Spezifität der Bestimmungsmethode ist bei entsprechender Berücksichtigung der Leerwertreaktionen an die Substratspezifität der 3 α -, 20 β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase (Handelspräparat 20 β -STDH) gekoppelt (Tab. 1). Das Enzym besitzt neben der 20 β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität eine 3 α -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität. Darüber liegen Untersuchungen sowohl von POCKLINGTON und JEFFERY (Lit. 6), als auch von GIBB und JEFFERY (Lit. 8, 9, 10) vor.

Unter den untersuchten C₁₉-Steroiden reagierten nur die Derivate der 3 α -01-5 α -Androstan-Reihe bei Gegenwart von NAD (Tab. 1) (Lit. 7). Die Substratumsätze waren nicht äquimolar. Nach einem Modellversuch kann man das Ausmaß einer eventuellen Beeinflussung des Endwertes der 20-Oxosteroidbestimmung im Urin durch die Androsteronderivate abschätzen (Abb. 18, Tab. 7) (Lit. 7).

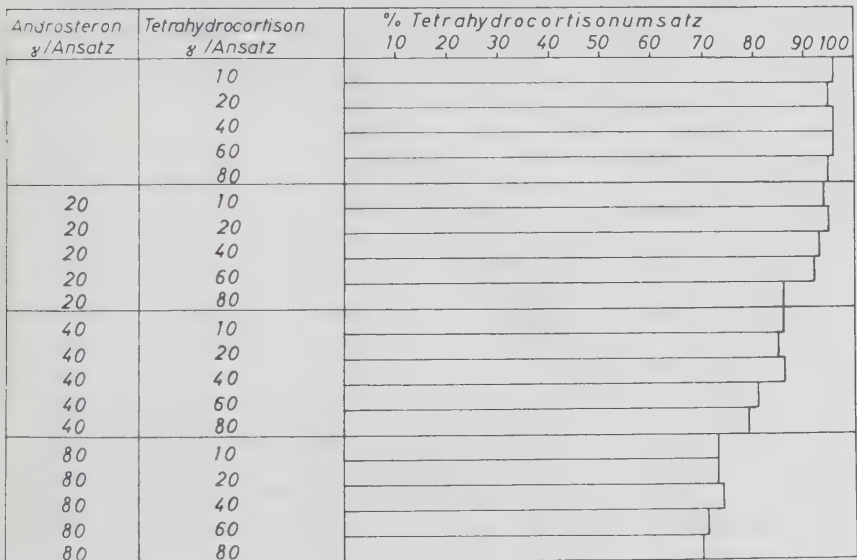
Verschiedenen Tetrahydrocortisonkonzentrationen wurden pro Ansatz verschiedene Mengen Androsteron zugesetzt. Die gemessenen Umsätze für Tetrahydrocortison nahmen mit steigendem Androsterongehalt ab. Diese Beobachtung ist als Ergebnis der Wirkung beider Enzymaktivitäten auf die beiden im Ansatz vorhandenen Substrate zu interpretieren.

Das bei der Reduktion der 20-Oxogruppe unter dem Einfluß der 20 β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität des Enzyms gebildete NAD wird durch die 3 α -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität bei der Oxidation der 3 α -Ol-Gruppe des Androsterons teilweise reduziert. Die meßbaren Extinktionsänderungen in diesen Gemischen sind als Resultanten der durch die beiden Enzymaktivitäten katalysierten Reaktionen und des sich einpendelnden Reaktionsgleichgewichts zu verstehen.

Eine Substratmenge von 20 γ Androsteron hat den meßbaren Umsatz von Tetrahydrocortison pro Ansatz nicht wesentlich beeinflußt (Lit. 7). Bis 60 γ Androsteron pro Ansatz ist auch der äquimolare Umsatz von 10 γ Tetrahydrocortison nicht wesentlich beeinträchtigt (Lit. 7).

Im Urin beträgt im Normalfall das Mengenverhältnis von 5 α Androstan-3 α -Ol-Derivaten zu 20-Oxosteroiden 1:3. Bei normaler 17-Oxosteroid-Konzentration im Urin ist mit einer Konzentration bis zu 10 γ Androsteronderivate pro Ansatz zu rechnen, so daß nach den Erfahrungen des Modellansatzes auch durch eine Verdoppelung der Konzen-

tration an Androsteronderivaten noch keine Beeinträchtigung des äquimolaren 20-Oxosteroidumsatzes zu befürchten ist. So kann man sagen, daß die quantitative Bestimmung von 20-Oxosteroiden mit der 20 β -STDH im Urin durch die 3 α -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität des Enzyms im allgemeinen nicht beeinflußt wird.



Tab. 7: Darstellung des Einflusses verschiedener Androsteronkonzentrationen auf den Tetrahydrocortisonumsatz (Lit. 7)

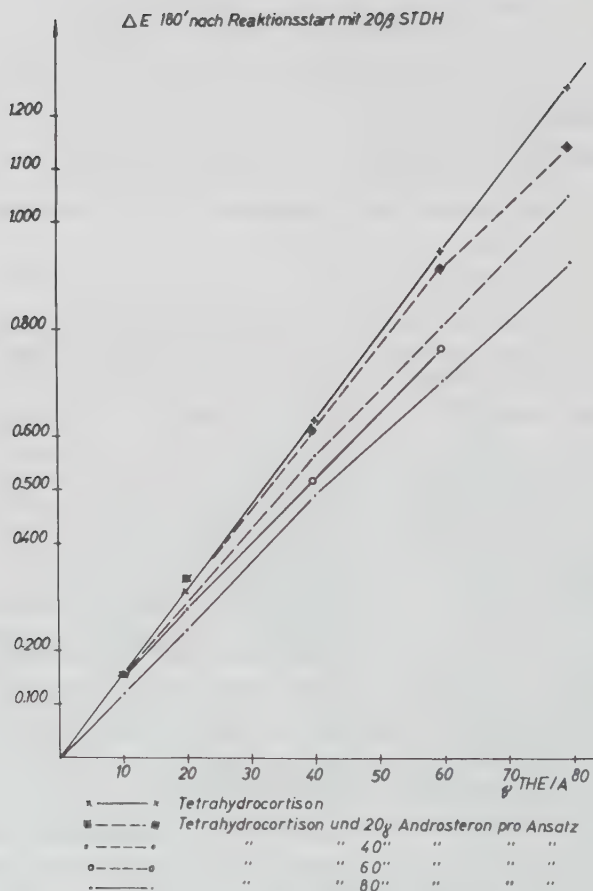


Abb. 18: Einfluß verschiedener Androsteronkonzentrationen auf den ΔE -Endwert verschiedener Tetrahydrocortisonkonzentrationen pro Ansatz. Die Messungen erfolgten am Photometer Eppendorf, Meßstrahlung war 334 nm, die Reaktionszeit betrug 180 min (Lit. 7).

D) Normalwerte

Die Ausscheidung der 20-Oxosteroide im Urin wurde bei 32 endokrinologisch gesunden Personen untersucht (Tab. 8, 9). Bei Berücksichtigung der doppelten Standardabweichung und unter Annahme einer Gaußschen Verteilungskurve ergab sich bei Männern ein Normalwertebereich von 9-42 mg/24 Std. und bei Frauen von 4-33 mg/24 Std.

Person	Methode mit Extraktions- und Reinigungsschritten mg 20 KS/24 Std.	Schnelltest mg 20 KS/24 Std.
Kuj	12,6	18,2
Kir	17,4	25,5
Leu	5,5	15,9
Zie	8,6	14,6
M.W	13,7	15,5
R.B	10,7	33,0
M.B	11,5	34,6
Str	22,0	32,8
Hma	24,2	33,0
Bma	20,8	38,0
All	14,2	21,3
Bur	7,2	23,7
Zir		23,9
	$\bar{X} = 14,03$	$\bar{X} = 25,38$
	$s = 5,98$	$s = 8,14$
	$2s = 11,96$	$2s = 16,28$
	$N = 12$	$N = 13$

Tab. 8: Ausscheidung der 20-Oxosteroide bei 13 endokrinologisch gesunden männlichen Personen (Bestimmung mit der 20 β -STDH)

Person	Methode mit Extraktions- und Reinigungsschritten mg 20 KS/24 Std.	Schnelltest mg 20 KS/24 Std.
Agr	11,0	21,4
Kwe	5,6	8,0
Sch	3,9	15,0
Hes	9,6	16,7
Wil	7,3	9,4
Rit	6,4	10,4
Büt	14,6	24,9
Wut	11,5	35,1
Klö	8,4	13,9
Aha	9,3	26,2
Hui	5,5	19,5
All	10,5	19,1
Bur	6,9	24,7
Die	8,0	12,6
Haa	8,9	17,4
Rem	15,6	33,1
Hei	13,2	20,0
Web	4,2	15,6
Wit	12,5	14,7
	$\bar{X} = 9,1$	$\bar{X} = 18,83$
	$s = 1,81$	$s = 7,41$
	$2s = 2,62$	$2s = 14,82$
	$N = 19$	$N = 19$

Tab. 9: Ausscheidung der 20-Oxosteroide bei 19 endokrinologisch gesunden weiblichen Personen
(Bestimmung mit der 20 β -STDH)

E) Vergleich mit anderen Methoden

Gegenüber anderen Bestimmungen der 20-Oxosteroide durch PORTER und SILBER, APPLEBY und NORBYMSKI oder die 20 β -STDH mit Extraktions- und Reinigungsschritten hat diese Methode den Vorteil, daß der materielle und arbeitsmäßige Aufwand sehr gering ist.

Mit dem PORTER-SILBER-Reagenz (Phenylhydrazin-Schwefelsäurelösung) werden selektiv die Steroide mit einer 17,21-Dihydroxi-20-Oxosteroidgruppe am C₁₇-Atom quantitativ erfaßt. Dies sind hauptsächlich die Tetrahydroderivate von Cortisol und Cortison, die etwa 40 - 50 % der Cortisolmetaboliten ausmachen. Nicht erfaßt werden von dieser Reaktion die Nebennierenrinden-Steroide vom Typ des Corticosterons und des Aldosterons, wie auch die Cortole und Cortolone. Die Normalwerte bei Bestimmungen im Urin betragen $7,3 \pm 4,4$ mg/24 Std. (3,3 - 12,0) (Lit. 11).

Bei Bestimmung der 17-Hydroxikortikoide nach APPLEBY und NORBYMSKI werden zusätzlich Cortol und Cortolon erfaßt. In Normalfällen betragen die Werte der 17-Hydroxikortikoide im Urin nach dieser Methode beim Mann 7,0 - 20,0 mg, bei der Frau 4,5 - 14,0 mg/24 Std. (Lit.11).

Die 17-Oxosteroidausscheidung repräsentiert in erster Linie die Androgene. Nur 5 % von ihr entstammen dem Cortisolstoffwechsel (Lit. 11), für den sie daher eine nur sehr geringe Aussagekraft besitzt.

Bei der Bestimmung der 20-Oxosteroide mit der 20 β -STDH mit Extraktions- und Reinigungsverfahren (Lit. 7) werden bei Normalpersonen für Frauen Ausscheidungsmengen von 4,0 - 20 mg/24 Std. und für Männer 5,5 - 24 mg/24 Std. im Urin gefunden. Hier wird ein Urinextrakt durch Extraktions- und Reinigungsschritte hergestellt, der zur Substratbestimmung benutzt wird. Die bei Frauen und Männern gefundenen Normalwerte sind mit denen der Methode von APPLEBY und NORYMERSKI weitgehend identisch. Dagegen erbrachte die Bestimmung der 20-Oxosteroide im 24-Stundenurin von endokrinologisch gesunden Personen nach der Kurzmethode mit 20 β -STDH bei Verzicht auf Extraktions- und Reinigungsschritte höhere Normalwertebereiche; bei Männern 9 - 42 mg, bei Frauen 4 - 33 mg pro Tag.

Das zu erwartende Spektrum der durch diese Methode bestimmten Oxosteroide wird im Vergleich mit anderen Methoden größer sein, die Verluste sind durch die einfachen Arbeitsschritte geringer, und so erklären sich hohe Wiederfindungsraten (Tab. 3, 4) und höhere Normalbereiche.

Durch dünnschichtchromatographische Reinigung der Extrakte werden die Wiederfindungsraten um 20 % schlechter. Ein solcher Reinigungsschritt ist unnötig, er bringt nur größere Verluste, die Spezifität der Methode wird dadurch nicht erhöht.

Speziell THB kann mit der 20 β -STDH in Gemischen von Steroidhormonen quantitativ bestimmt werden (Lit. 13). Dabei wird die unterschiedliche Reaktionskinetik von Tetrahydrocorticosteron gegenüber den anderen 20-Oxosteroiden genutzt. In Reaktionsgemischen mit Reinsubstanzen und in Urinen sind bis zu 30 min alle 20-Oxosteroide bis auf Tetrahydrocorticosteron umgesetzt. Der meßbare NADH-Verbrauch nach der 45. Minute bis zum Reaktionsende - 240 min nach Reaktionsstart - wird nach Abzug der entsprechenden Leerwerte für die Berechnung des Tetrahydrocorticosterons benutzt. Nach der Ermittlung der Funktionskonstanten der nach einer Exponentialfunktion verlaufenden Reaktion ist die Berechnung des Tetrahydrocorticosteronanteils aus den Ansätzen möglich. Voraussetzung ist, daß er groß genug ist, um noch erfaßt zu werden.

Dies ist bei der Methode mit 20 β -STDH nach Extraktions- und Reinigungsschritten der Fall, da hier 2,5 ml Urin in 1 ml Glyzerin-Puffer-Gemisch konzentriert zum Ansatz kommen. Da für die dargestellte Kurzmethode nur 0,5 ml Urin zum Ansatz kommen, ist der Anteil an Tetrahydrocorticosteron für diese Berechnung somit zu gering. Die quantitative Bestimmung des THB im Urin ist mit dieser Methode daher nicht möglich.

Zusammenfassung

Eine 3α -, 20β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase ist zur quantitativen Bestimmung von 20 -Oxosteroiden im Urin geeignet. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von 20 -Oxo-gruppen der C_{21} -Steroide zu 20β -Alkoholen, wobei NADH Wasserstoffdonator ist und der äquimolare NADH-Verbrauch als Meßgröße dient.

Das beschriebene Verfahren erfüllt trotz Verzicht aufwendiger Extraktions- und Reinigungsschritte die Zuverlässigkeitskriterien, denn die Grundbedingungen für eine brauchbare Steroidbestimmung sind erfüllt (Lit. 12):

- a) Spezifität: Die 20β -STDH ist substratspezifisch und zeigte keine Reaktion mit Fremdsubstanzen im Urin.
- b) Genauigkeit: Die Wiederfindungsraten von zugesetzten reinen Steroiden liegen über 75 % (90 - 100 %).
- c) Präzision: Die Standardabweichung beträgt nicht mehr als 10 %.
- d) Empfindlichkeit:

Die kleinsten bestimmbaren Steroidmengen liegen in biologischen Bereichen.

Die Spezifität des Enzyms erfährt allerdings eine Einschränkung. Neben der 20β -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität katalysiert die 3α -Hydroxisteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität des Enzyms die Reduktion der 3α -Hydroxigruppe von 5α -Androstanderivaten bei Anwesenheit

von NAD in einer nicht äquimolaren Reaktion. Es wurden bisher keine 17 α -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase- und keine 3 β -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität gefunden (Lit. 6).

Die 3 α -Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase-Aktivität wird ausführlich von GIBB und JEFFERY (Lit. 8, 9, 10) beschrieben. In Modellversuchen mit Gemischen von Tetrahydrocortison und Androsteron zeigt sich, daß bei der Direktbestimmung der 20-Oxosteroide mit 20 β -STDH im Urin diese zweite Enzymaktivität vernachlässigt werden kann (Lit. 7).

Es besteht die Möglichkeit, die Methode ohne Extraktions- und Reinigungsschritte auf eine erheblich kürzere Reaktionszeit zu bringen, indem man die eingesetzte 20 β -STDH-Menge pro Ansatz auf das 5-fache der bisher benutzten erhöht (Abb. 15).

Zur quantitativen Bestimmung des Tetrahydrocorticosterons (Lit. 13) ist diese Methode nicht geeignet. Man muß das Verfahren mit Extraktions- und Reinigungsschritten anwenden.

Die Normalwerte liegen verständlicherweise aufgrund der Spezifität und der guten Wiederfindungsraten der Methode höher als bei den anderen vergleichbaren Verfahren (PORTER und SILBER, APPLEBY und NORZYMBERSKI, Bestimmung der 20-Oxosteroide durch die 20 β -STDH mit Extraktions- und Reinigungsschritten).

Das Bestimmungsverfahren besitzt die zu fordernden Zuverlässigkeitskriterien und hat dabei den Vorteil, daß der materielle und arbeitsmäßige Aufwand gering ist.

Tab. 10: Übersicht der in der Arbeit benutzten Nomenklatur der Steroide

Trivialbezeichnung	Chemische Bezeichnung	Symbol
Progesteron	Δ^4 -Pregnen-3, 20-dion	
Pregnandiol	Pregnan-3 α , 20 α -diol	
Cortisol	Δ^4 -Pregnen-11 β , 17 α , 21-triol-3, 20-dion	F
Tetrahydrocortisol	Pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 21-tetraol-20-on	THF
Allotetrahydrocortisol	5 α -Pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 21-tetraol-20-on	Allo THF
Cortison	Δ^4 -Pregnen-17 α , 21-diol-3, 11, 20-trion	E
Tetrahydrocortison	Pregnan-3 α , 17 α , 21-triol-11, 20-dion	THE
Reichsteins Compound S	Δ^4 -Pregnen-17 α , 21-diol-3, 20-dion	S
Tetrahydro-Reichsteins Compound S	Pregnan-3 α , 17 α , 21-triol-20-on	THS
Corticosteron	Δ^4 -Pregnen-11 β , 21-diol-3, 20-dion	B
Tetrahydrocorticosteron	Pregnan-3 α , 11 β , 21-triol-20-on	THB
Allotetrahydrocorticosteron	5 α -Pregnan-3 α , 11 β , 21-triol-20-on	Allo THB
Desoxycorticosteron	Δ^4 -Pregnen-21-diol-3, 20-diol	DOC
Tetrahydrodesoxycorticosteron	Pregnan-3 α , 21-diol-3, 20-dion	THDOC
11-Dehydrocorticosteron	Δ^4 -Pregnen-21-Ol-3, 11, 20-trion	A
Tetrahydro Compound A	Pregnan-3 α , 21-diol-11, 20-dion	THA
β Cortolon	Pregnan-3 α , 11 α , 20 β , 21-tetraol-11-on	
Testosteron	Δ^4 -Androsten-3-on-17 β -Ol	
Androsteron	5 α -Androstan-3 α -Ol-17-on	
Epiandrosteron	5 α -Androstan-3 β -Ol-17-on	

Trivialbezeichnung	Chemische Bezeichnung	Symbol
11 β -Hydroxyandrosteron	5α -Androstan-3 α , 11 β -diol-17-on	
11 α -Hydroxyandrosteron	5α -Androstan-3 α , 11 α -diol-17-on	
11-Ketoandrosteron	5α -Androstan-3 α -Ol-11, 17-dion	
Δ 4-Androstendion	Δ 4-Androsten-3, 17-dion	
Dehydroepiandrosteron	Δ 5-Androsten-3 β -Ol-17-on	DHA
Ätiocholanolon	5 β -Androstan-3 α -Ol-17-on	
11 β -Hydroxyätiocholanolon	5 β -Androstan-3 α , 11 β -diol-17-on	
11-Ketoätiocholanolon	5 β -Androstan-3 α -Ol-11, 17-dion	
17 β -Hydroxyätiocholan-3-on	5 β -Androstan-17 β -Ol-3-on	
Ätiocholan-3, 11, 17-trion	5 β -Androstan-3, 11, 17-trion	
Östron	Δ 1, 3, 5(10)-Östratrien-3 β -Ol-17-on	
Östriol	Δ 1, 3, 5(10)-Östratrien-3, 17 β , 16 α -triol	
17 β -Östradiol	Δ 1, 3, 5(10)-Östratrien-3, 17 β -diol	
Dexamethason	9α -Fluor-16 α -Methylprednisolon	

Literaturverzeichnis

- 1) G. NESEMANN, H.J. HÜBENER, R. JUNK, J. SCHMIDT-THOME:
Biochem. Z. 333, 88 (1960)
- 2) G. NESEMANN, H.J. HÜBENER, J. SCHMIDT-THOME:
Biochem. Z. 336, 329 (1962)
- 3) H.J. HÜBENER, F.G. SAHRHOLZ:
Biochem. Z. 333, 95 (1960)
- 4) H.J. HÜBENER, L.O. LEHMANN:
Hoppe Seyler Z'physiolog. Chemie
313 124 (1958)
- 5) J. SCHMIDT-THOME, G. NESEMANN, H.J. HÜBENER,
I. ALESTER: Biochem. Z. 336, 322 (1962)
- 6) POCKLINGTON, J. JEFFERY:
Eur. J. Biochem. 7, 63 (1968)
- 7) H. KUJAWSKI: Dissertation 1975
- 8) W. GIBB, J. JEFFERY:
Biochem. Biophys. Acta 268, 13 (1972)
- 9) W. GIBB, J. JEFFERY:
Eur. J. Biochem. 23, 336 (1971)

10) W. GIBB, J. JEFFERY:

Eur. J. Biochem. 25, 136 (1972)

11) SCHÖN-SÜDHOF: Biochem. Befunde in der DD der inneren
Krankheiten; Thieme, 1960

12) J. THAMM: Methodik, Fehlerquellen und Deutung
der Corticosteroidbestimmung im Harn;
Der Internist, Jg. 4, Heft 12, Dez. 1963

13) H. ZIES: Dissertation 1975

14) H.J. HÜBENER: Methoden der enzymatischen Analyse,
herausgegeben v. H.U. Bergmeyer,
Verlag Chemie, Weinheim / Bergstr. (1962)

Herrn Chefarzt Dr. med. R. A L L N E R, Leiter des
Zentrallabors des akademischen Lehrkrankenhauses
der Universität Marburg, in Fulda, danke ich für
die Überlassung des Themas, für seine Unterstützung
und die Stellung eines Laborplatzes.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren
und Dozenten:

Arndt, Bergmann, Buchholz, Büsing, Busch, Daume,
Dittrich, Dombrowski, Doss, Eißner, Förster, Frank,
Friederich, Ganz, Geissler, Glanz, Graul, Hamelmann,
Hamm, Hardewig, Havemann, Heene, Hering, Herrmann,
Heß, Hielscher, Hildebrandt, Hilgermann, Hirsch,
Hofmann, Horn, Hort, Huch, Jacob, Jahrreiss, Kaffarnik,
Kalbfleisch, Karl, Klaus, Klein, Kleine, Kleinsasser,
Koransky, Kummer, Lauer, Linneweh, Lütcke, Lutz,
Maroske, Martini, Oepen, Ortmann, Pots, Riecken,
Rodeck, Rohen, Schiff, Schleyer, Schmidt, Schmitz-
Moormann, Seidel, Siegert, Siemer, Stöppler, Stoffel,
Straub, Tischendorf, Thoenes, Vahs, Welge-Lüssen,
Willenbockel.

Lebenslauf

Am 27. 12. 1951 wurde ich als Sohn des Technischen Angestellten Günter Wuttke und seiner Ehefrau Erna, geb. Büttner, in Fulda geboren.

Vier Jahre lang besuchte ich die Volksschule in Fulda, anschließend das Freiherr-vom-Stein-Gymnasium. Dort bestand ich am 19. Juni 1970 die Reifeprüfung im naturwissenschaftlichen Zweig.

Im Wintersemester 1970/71 immatrikulierte ich mich an der Universität Köln im Fach Medizin und legte 1973 die ärztliche Vorprüfung ab. Danach veränderte ich meinen Studienplatz nach Marburg. Die ärztliche Prüfung lege ich nach dem 12. Semester des Studiums der Medizin 1976 ab.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"Ein Schnelltest zur quantitativen Bestimmung der 20-Oxosteroide mit Hilfe einer ~~3α~~- 20β-Hydroxysteroid:NAD-oxido-reduktase direkt im Urin"

in dem Zentrallabor des akademischen Lehrkrankenhauses der Universität Marburg, Fulda, unter Leitung von Herrn Chefarzt Dr. med. R. Allner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Fachbereich Humanmedizin ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den

23.1.1976

Michael Wonne



